

胃の壁細胞はラセン菌を消化する

Intracellular digestion of gastric spirilla in gastric parietal cells of the Japanese monkey

鈴木 一 憲

Kazunori Suzuki

要約

胃のラセン菌 (*Gastrospirillum*) は菌体がきつく回転し、菌の両端に鞭毛を持っていた。このような形態の特徴は胃粘膜に感染して胃炎を引き起こすと考えられているピロリ菌が鞭毛を一端にのみ持っている事と著しく異なっていた。ラセン菌は壁細胞の細胞内細管と細胞質の中に入り込んでいた。壁細胞の細胞質の中でラセン菌は膜で細胞質から仕切られており、形態的に変化していた。この膜で囲まれたライソゾームの中で変形したラセン菌とともに電子密度の高いラメラ状構造物やいろいろな大きさの小胞が見られた。酸性フォスファターゼ活性は酵素細胞化学的にライソゾーム内のラセン菌の周りに検出された。

キーワード：ニホンザル、ラセン菌、壁細胞、ライソゾーム

はじめに

胃の中に生息しているラセン状の微生物については多くの報告が見られる。この微生物は当初スピロヘータの仲間と考えられたが¹⁾、その後ラセン状の細菌とされ、キャンピロバクターの仲間とされた²⁾。このラセン菌は大型できついラセンを持っており、イヌ³⁾、ネコ⁴⁾、ブタ⁵⁾、フェレット⁶⁾ など多くの動物種で確認され、霊長類ではヒト^{7, 8)} の他、アカゲザル⁹⁻¹²⁾、ヒビ¹³⁾で確認されている。Sato らと Dubois らは透過型電子顕微鏡でアカゲザルの胃粘膜を観察して、このラセン菌が壁細胞の中に見られることを報告している^{9, 12)}。これらのラセン菌は、その後ヒトで発見された小型でゆるいS字状のラセン菌で胃炎や胃潰瘍を起こす可能性が指摘されているヘリコバクターピロリ (ピロリ菌 *Helicobacter pylori*)^{14, 15)} と一時期混同されていたが、現在では区別され *Gastrospirillum* と呼ばれている。

塩酸を分泌している壁細胞は分泌の亢進期と休止期で細胞内の膜系が大きく動くことが知られており、亢進期には頂部細胞膜と連絡している細胞内分泌細管 intracellular secretory canaliculi が発達しており、一方分泌の休止期には細胞内分泌細管がほとんど見られなくなり、細胞質内には細管小胞系 tubulovesicular system と言われる壁細胞に固有の細胞内小器官がたくさん出現する^{16, 17)}。このダイナミックな膜系の動態は分泌刺激により瞬時に引き起こされ、細管小胞系の膜が頂部細胞膜とつながって細胞内分泌細管になると考えられている^{18, 19)}、休止期に向かいこの増大した頂部細胞膜が縮小していく機序の詳細については明確になっていない。

本研究においては、ニホンザル (*Macaca fuscata fuscata*) の胃におけるラセン菌の確認と壁細胞内でどのような動きが見られるかを超微形態学的、酵素細胞化学的に調べ、壁細胞頂部細胞膜の細胞内取り込み機序について考察を行う事を目的とする。

材料および方法

動物

本研究では8匹のニホンザルを用いた。用いた動物はすべて京都大学霊長類研究所において飼育され、胃腸に疾患歴の無い健康な個体を用いた。動物は一晚絶食をさせ、ペントバルビタール大量投与による中枢性深麻酔下で総頸動脈から放血を行い実験殺をした。なお、実験動物の取り扱い、実験殺の手法は京都大学霊長類研究所動物実験ガイドラインに従った。

光学顕微鏡のための標本の作製

実験殺後、速やかに胃を摘出し、小片を切り出して固定した。固定液には0.2Mリン酸緩衝液の10%ホルマリン液を用い、1週間以上固定した。標本はアルコール系列で脱水し、トルエンで置換した後パラフィンに包埋した。パラフィン切片作成用滑走式マイクローム（ヤマト）で5 μ mの切片を作成し、脱パラフィン後ヘマトキシリン液とエオジン液で一般染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

超微形態観察のための標本作製

胃粘膜の新鮮小片はさらに細切し、固定した。前固定はpH 7.4に調整した0.1Mカコジル酸緩衝液の2%パラフォルムアルデヒド2%グルタルアルデヒド溶液に2から6時間浸漬をし、後固定は同じ緩衝液の1%四酸化オスミウム溶液で1時間行った。

透過型電子顕微鏡標本の作製には固定後の標本をアルコール系列で脱水した後、プロピレンオキシドで2度置換をし、エポキシ樹脂（TAAB 812）に包埋した。包埋標本は60℃の恒温槽で数日間重合させた後、ウルトラマイクローム（RMC MT-7000）で超薄切をし、飽和ウラン酢酸液とクエン酸鉛液で二重染色をし、透過型電子顕微鏡（日本電子 100 SX）で観察をした。1 μ mの厚切り切片はトルイジンブルー染色を行い、光学顕微鏡で観察をした。

走査型電子顕微鏡標本作製には前固定後の標本を液体窒素で急速に凍結を行い、その中でナイフを当てて切断を行った。その後アセトン系列で脱水し、酢酸イソアミルで置換をし、臨界点乾燥後イオン蒸着を行い、走査型電子顕微鏡（日立 S 800）で観察をした。

酵素細胞化学

実験殺後の新鮮小片をpH 7.4に調整した0.1Mカコジル酸緩衝液の1%パラフォルムアルデヒド1%グルタルアルデヒド溶液で1時間固定をした。その後、緩衝液で良く洗浄を行い、寒天に包埋をし、マイクロスライサー（堂阪イーエム）で40 μ mの切片を作製し、Gomori法²⁰⁾で酸性フォスファターゼに関する酵素組織化学反応を行った。反応後の切片は後固定を行い、エポキシ樹脂に包埋後超薄切片を作成し、ウランと鉛の2重染色を施さない無染色標本を透過型電子顕微鏡で観察をした。

結果

光学顕微鏡の結果

実験に用いた全てのニホンザルの胃底腺の内腔にラセン状の菌が観察された。一部の菌は壁細胞の細胞内細管にも見られた。胃粘膜はリンパ球や好中球の浸潤像が見られたが、びらんや潰瘍など重度な病理所見は見られなかった。

走査型電子顕微鏡による観察

断面にラセン菌が観察された（図1）。ラセン菌は長さ約9 μ mでねじれの強いラセン形

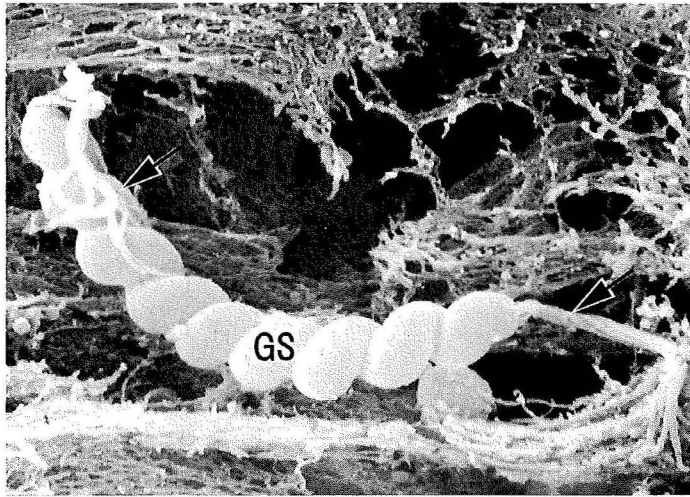


図1 ラセン菌の走査型電子顕微鏡像

8回きつく回転したラセン菌 (GS) の両端に鞭毛 (→) が観察された。

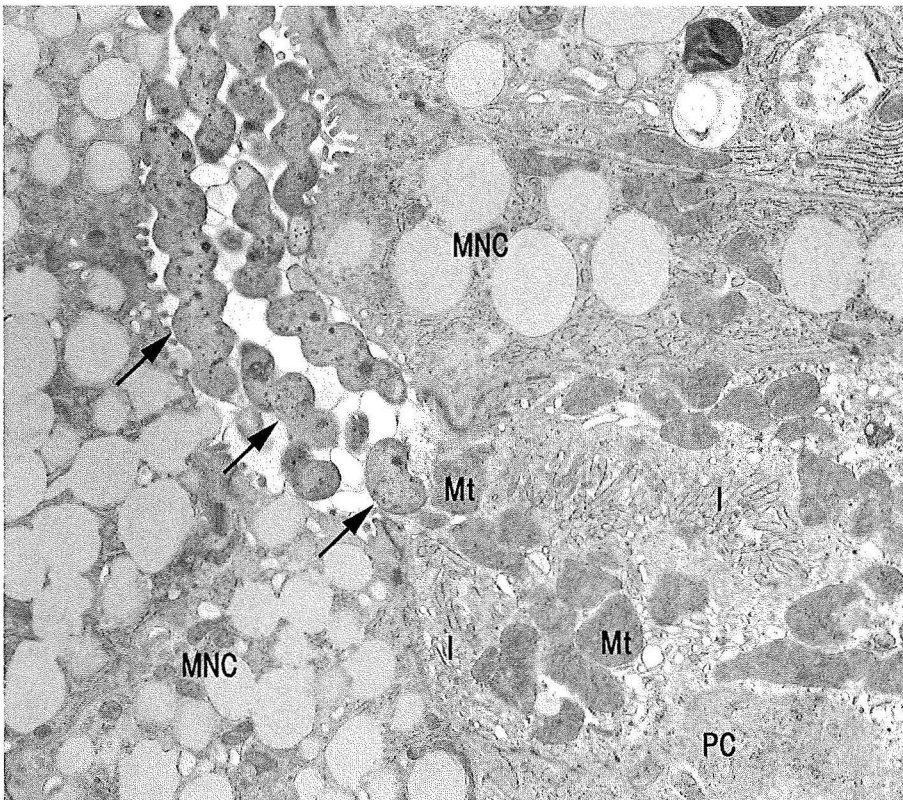


図2 胃底腺腺腔の透過型電子顕微鏡像

多数のラセン菌 (→) が壁細胞 (PC) や頸部粘液細胞 (MNC) の頂部細胞膜で形成された腺腔内に観察された。一部のラセン菌は壁細胞の細胞内細管 (I) に接していた。Mt: 壁細胞のミトコンドリア

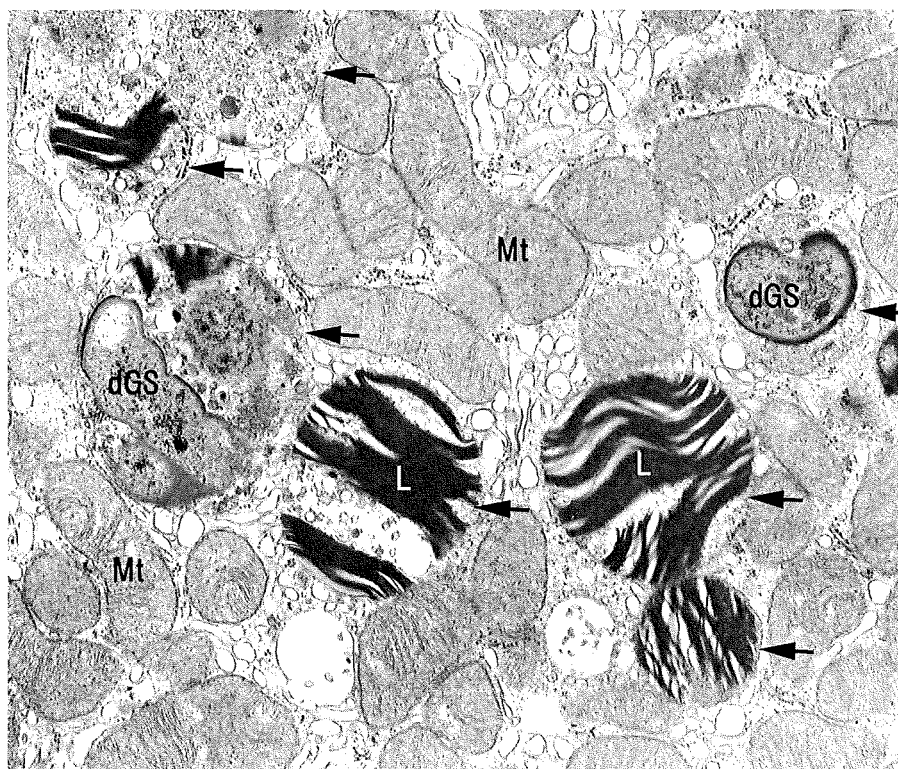


図3 壁細胞細胞質の透過型電子顕微鏡像

膜で画された多数の胞状構造 (→) の中に変形したラセン菌 (dGS) やいろいろな大きさの小胞と電子密度の高いラメラ状構造物 (L) が観察された。

を示し、ラセンのピッチが約 $0.8-0.9\mu\text{m}$ 、太さは約 $0.6\mu\text{m}$ であり、両端に数本の鞭毛を持っていた。

透過型電子顕微鏡による観察

胃底腺内腔に多数のラセン菌が観察された(図2)。ラセン菌の菌体には電子密度の高い顆粒状構造物が観察された。菌体の両端は電子密度が薄かった。細胞膜は2重であった。一部のラセン菌は壁細胞など胃底腺を構成する細胞の頂部細胞膜の微絨毛構造物に接しているものも観察された。

壁細胞の細胞質には超微形態的にラセン菌が取り込まれ、2次ライソゾームとなったと考えられる胞状構造物が多数観察された(図3)。この構造物の中には未消化と思われる変形した菌体の一部や鞭毛の一部、消化されたものから作られたと思われる電子密度の高いラメラ状構造物やいろいろな大きさの小胞構造物が観察された。

酸性フォスファターゼの酵素細胞化学

酸性フォスファターゼが局在しているところは鉛の沈着により、高い電子密度で観察される。壁細胞の細胞質の中には取り込んだラセン菌の周囲に高い電子密度が観察された(図4)。鞭毛周囲にも高い電子密度が観察され、細胞内消化の過程が観察された。

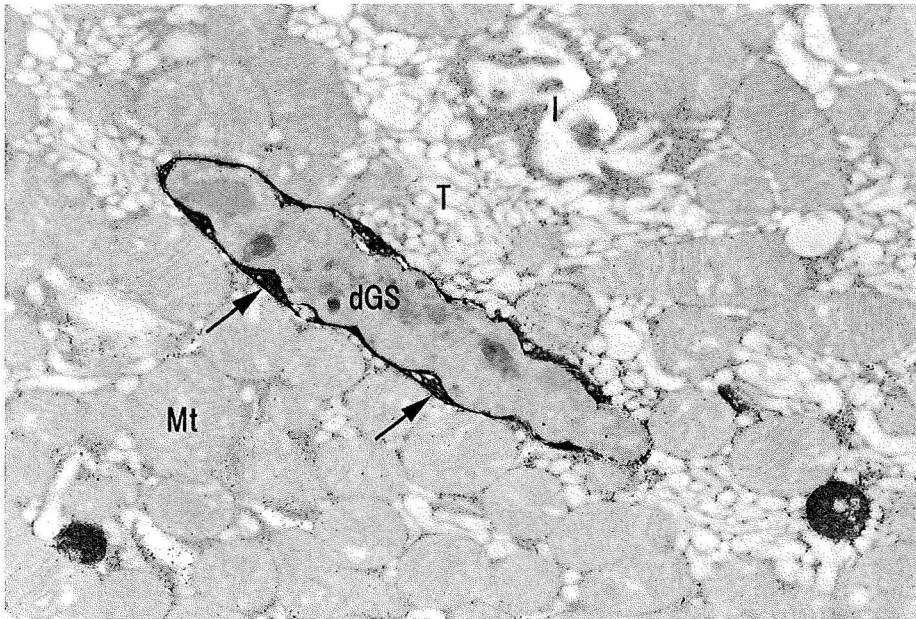


図4 酸性フォスファターゼの細胞化学的染色を施した壁細胞細胞質の透過型電子顕微鏡像

変性したラセン菌の周りに反応陽性の電子密度の高い領域が確認された。

I：細胞内分泌細管、 T：細管小胞系

考察

ニホンザル胃粘膜で観察されたラセン菌はこれまでサル類で報告されたものと類似した形態を示した。胃炎、胃潰瘍の原因菌と特定されたピロリ菌と比べて大型で、きついらせん型をしていた。観察したニホンザルの全ての個体でラセン菌が観察され、病理所見が軽度の炎症反応のみであったことから、常在性の高い菌であると考えられる。

ラセン菌が胃底腺の細い管腔内に多数見られたことから、このラセン菌は鞭毛により移動を行い、胃底腺管腔に侵入すると考えられる。さらに壁細胞に近づいたラセン菌は酸分泌時の細胞内細管に侵入しており、酸性環境を好み、酸に抵抗性があると考えられる。

壁細胞の細胞内には明らかにラセン菌の構造的特徴を示す断片を含む小胞構造が見られた。その中には形態変化を起こしたラセン菌の菌体や鞭毛、細胞膜が消失している菌体の細胞質と同じ構造も見られることから、この小胞は細胞内に膜で包まれてラセン菌を取り込んで形成された2次ライソゾームであると考えられる。消化されたものは電子密度の高いラメラ状構造物となり、消化が終わるとラメラ小体として遺残すると思われる。

超微形態学的にはラセン菌が壁細胞の細胞質内で2次ライソゾームとなり、消化を受ける事が示唆されたが、2次ライソゾームであることを確認するためにライソゾームの消化酵素の酵素細胞化学的指標である酸性フォスファターゼの検出を行った。この結果、壁細胞の細胞質内に反応により鉛が沈着した電子密度の高い領域に取り囲まれたラセン菌が観察された。このことより、酵素細胞化学的にもラセン菌は2次ライソゾームの中で1次ライソゾームから消化酵素の放出を受け、細胞内消化されたことが確認された。壁細胞の中でラセン菌が細胞内消化を受けることを酵素細胞化学的に報告したのは本報告が初めてである。

図5はラセン菌が壁細胞の中に取り込まれ、細胞内消化を受ける過程の模式図である。1

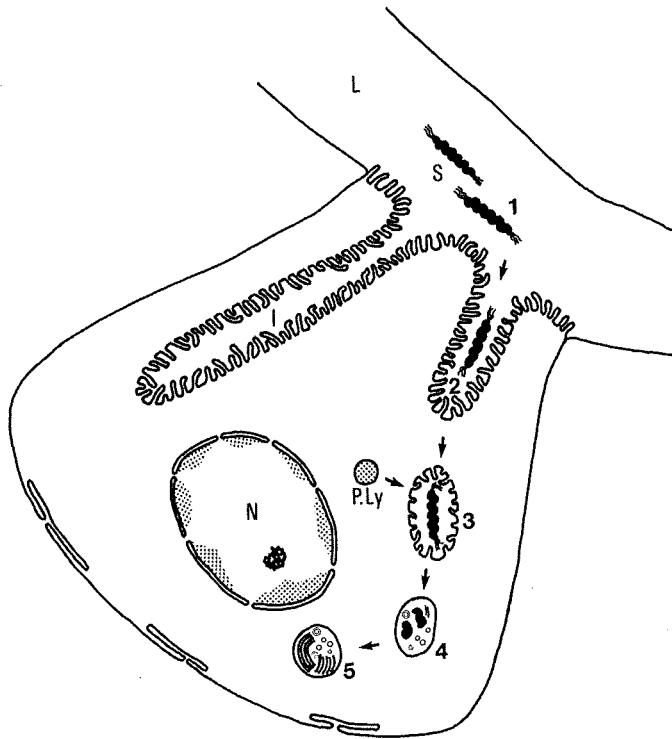


図5 ニホンザル壁細胞におけるラセン菌の細胞内消化過程を示す模式図

1：腺腔内のラセン菌、2：細胞内分泌細管内のラセン菌、3：内胞化された細胞内分泌細管内のラセン菌、4：消化過程で変形したラセン菌、5：消化され、ラメラ状構造の詰まった遺残小体 S：ラセン菌 I：細胞内分泌細管 P. Ly：一次ライソゾーム N：核

は胃底腺腺腔 (L) に侵入したラセン菌 (S) を示しており、2は細胞内分泌細管 (I) に入り込んだラセン菌を示している。その後、3では細胞内分泌細管が内胞化し、ゴルジ装置より分泌された1次ライソゾーム (P. Ly) から消化酵素が放出されると考えられる。4ではラセン菌が消化を受け、5では消化された物質がラメラ構造を示す遺残小体として細胞質内に残ることを示している。

壁細胞の頂部細胞膜は酸分泌時に拡大し、細胞内分泌細管になることが知られている。この細胞膜には $H^+ATPase$ が含まれており²¹⁻²⁴⁾、酸分泌時に ATP のエネルギーを用いてプロトンを分泌しており、壁細胞における塩酸分泌に直接関与している。酸分泌が終了すると頂部細胞膜は減少し、細胞内分泌細管はほとんど見られなくなる。このとき、頂部細胞膜がどのような機序で減少するかについては明確になっていないが、頂部細胞膜が腺腔に脱落する脱落説と、細胞内に取り込まれて再利用されるリサイクル説が考えられている。酸分泌が休止期に向かうと細胞内分泌細管の管腔内の電子密度がやや高くなることが知られているが、これは細胞内分泌細管が内胞化したと考えられており、その後2次ライソゾーム化して細胞内消化を受け、その後膜成分が細管小胞系の形成に使われるのではないかとリサイクル説では考えられている。しかし、内胞化して細胞内に取り込まれた膜成分が細胞内消化を受けるといふ直接的な証拠は見つかっていない。本研究ではラセン菌が頂部細胞膜に包まれて細胞内に

取り込まれ、その後2次ライソゾームとして細胞内消化を受けていることを酵素細胞化学的に証明した。このことは、頂部細胞膜の少なくとも一部は細胞内に取り込まれ、細胞内消化を受けていることを示している。このことから、本研究では壁細胞細胞膜のリサイクル説を支持する証拠を提出した。

参考文献

1. Doenges, J.L., Spirochetes in gastric glands of *Macacus rhesus* and humans without definite history of related disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38: 536-538, 1938.
2. Bronsdon, M.S., F.D. Schoenknecht, *Campylobacter pylori* isolated from the stomach of the monkey, *Macaca nemestrina*. *J. Clin. Microbiol.*, 26(9) : 1725-1728, 1988.
3. Henry G.A., P.H. Long, J.L. Borns, D.L. Charbonneau, Gastric spirillosis in beagles. *Am. J. Vet. Res.*, 48(5) :831-836, 1987.
4. Lee S., S.L. Hazell, J.O' Rourke, S. Kouprach, Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infection and Immunity*, 56(11) : 2843-2850, 1988.
5. Lambert, J.R., M. Borromeo, K.J. Pinkard, H. Turner, C.B. Chapman, M.L. Smith, Colonization of gnotobiotic piglet with *Campylobacter pyloridis*- an animal model? *J. Infect. Dis.*, 155(6) : 1344, 1987.
6. Fox, J.G., P. Correa, N.S. Taylor, A. Lee, G. Otto, J.C. Murphy, R. Rose, *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets. *Gastroenterology*, 99: 352-361, 1990.
7. Dye, K.R., B.J. Marchall, H.F. Frierson Jr., R.L. Guerrant, Ultrastructure of another spiral organism associated with human gastritis. *Digest. Dis. Sci.*, 34(11) : 1787-1791, 1989.
8. Yali, Z., N. Yamada, M. Wen, T. Matsuhisa, M. Miki, *Gastrospillum hominis* and *Helicobacter pylori* infection in Thai individuals: Comparison of histopathological changes of gastric mucosa. *Pathol. Int.*, 48(7) : 507-511, 1998.
9. Sato T, TA. Takeuchi, Infection by spirilla in the stomach of the Rhesus monkey. *Vet Pathol.*, 19 (Suppl 7) :17-25, 1982.
10. Baskerville A., D.G. Newell, Naturally occurring chronic gastritis and *C. pylori* infection in the Rhesus monkey: a potential model for gastritis in man. *Gut*, 29: 465-472, 1988.
11. Dubois A. A. Tarnawsky, N. Fiala, W. Dabros, J. Stachura, L.M. Heman-Ackah, E. Montgomery, F. Lyons, C. McQueen, Direct evidence for parietal cells invasion and injury by *Campylobacter pylori*-like organisms in rhesus monkeys. An animal Model for gastritis? *Gastroenterology*, 95(5, Pt.2) : A105, 1988.
12. Dubois A. A. Tarnawsky, D.G. Newell, N. Fiala, W. Dabros, J. Stachura, H. Krevan L.M. Heman-Ackah, Gastric injury and invasion of parietal cells by spiral bacteria in rhesus monkeys. *Gastroenterology*, 100: 884-891, 1991.
13. Curry A., D.M. Jones and J. Eldridge, Spiral organisms in the baboon stomach. *Lancet*, 2: 634-635, 1987.
14. Marshall B.J., McGeachie D.B., Rogers P.A., Glancy R.J., Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust.*, 15: 142(8) :439-444, 1985.

15. Morris A, Nicholson G., Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol.*, 82(3) : 192-199, 1987.
16. Forte J.G., J.A. Black, T.M. Forte, T.E. Machen, J.M. Wolosin, Ultrastructural changes related to functional activity in gastric oxyntic cells. *Am. J. Physiol.* , 241: G349-G358, 1982.
17. Ito S.: Functional gastric morphology. In *physiology of the gastrointestinal tract*, ed. by Johnson L.R. Raven Press, New York, p517-550, 1981.
18. Forte J.G., X. Yao, The membrane-recruitment-and-recycling hypothesis of gastric HCl secretion. *Trends in Cell Biol.*, 6: 45-48, 1996.
19. Pettitt J.M., I.R. Driel, B.H. Toh, P.A. Gleeson, From coiled tubules to a secretory canaliculus: a new model for membrane transformation and acid secretion by gastric parietal cells. *Trends in Cell Biol.*, 6: 49-53, 1996.
20. GOMORI G., Histochemical methods for acid phosphatase. *J Histochem Cytochem.* 4(5) :453-461, 1956.
21. Sachs G, T. Berglindh.: Physiology of the parietal cell. In *physiology of the gastrointestinal tract*, ed. by Johnson L.R. Raven Press, New York, p567-602, 1981.
22. Faller L., R.Jackson, D. Mukidjam, E. Rabon, G. Saccomani, G. Sachs, A. Smolka. Mechanistic aspects of gastric (H⁺+K⁺)-ATPase. *Ann. NY Acad. Sci.* 402:146-163,1982
23. Malinowska, D., G. Sachs, Cellular mechanisms of acid secretion. *Clin. Gastroenterol.*, 13: 309-326, 1984.
24. Wolosin, J.M., Ion transport studies with H⁺-K⁺-ATPase-rich vesicles: implications for HCl secretion and parietal cell physiology. *Am. J. Physiol.*, 248: G595-G607, 1985.

Abstracts

Gastric spirilla (*Gastrospirillum*) showed a tightly coiled body with flagella extended from both of the microorganism polar ends. The morphological characteristics indicated that the microorganisms were different from *Helicobacter pylori* with unipolar flagella which might cause gastritis in the infected gastric mucosa. Gastric spirilla were associated closely with parietal cells and penetrated both the intracellular canaliculi and cytoplasm of parietal cells. In the cytoplasm of parietal cells, they were demarcated from the cytoplasm by cytoplasmic membranes and showed degeneration. Sometimes, the degenerated microorganisms were co-present with dense lamellar structure and various sized vesicles in a lysosomal vacuole. Acid phosphatase activity is detected around gastric spirilla by enzyme cytochemistry.

Key words: Japanese monkeys, gastric spirilla, parietal cells, lysosome